

Aus der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie
der Haustiere mit Ambulatorium
Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. M. Berchtold

Arbeit unter der Leitung von Dr. R. Müller

**AGGLUTINIERENDE ANTIKÖRPER IN BLUT – UND MILCHSERUM
DES RINDES
NACH VAKZINATION MIT STREPTOCOCCUS AGALACTIAE**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär - medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von
ALICE MATHYS
Tierärztin

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. M. Berchtold, Referent
Pd Dr. R. L. von Fellenberg, Korreferent

Zürich 1980



Aus der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie
der Haustiere mit Ambulatorium
Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. M. Berchtold

Arbeit unter der Leitung von Dr. R. Müller

**AGGLUTINIERENDE ANTIKÖRPER IN BLUT – UND MILCHSERUM
DES RINDES
NACH VAKZINATION MIT STREPTOCOCCUS AGALACTIAE**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär - medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von
ALICE MATHYS
Tierärztin

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. M. Berchtold, Referent
Pd Dr. R. L. von Fellenberg, Korreferent

Zürich 1980

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	4
B. LITERATURBESPRECHUNG	6
1. Das Immunsystem des Rindes	6
2. Die Immunantwort in der Milchdrüse	7
a) Systemische Bildung und passive Filtration der Antikörper vom Blut in die Milch	7
b) Systemische Bildung und aktiver Transport der Antikörper vom Blut in die Milch	8
c) Lokale Antikörpersynthese im Euter	9
3. Möglichkeiten der Steigerung des Antikörper- gehalts von Blut und Milch	9
4. Immunität gegen Streptococcus agalactiae	11
5. Vakzinationsversuche mit Streptococcus agalactiae	12
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	14
I. Totvakzine ohne Adjuvans	14
1. Material und Methodik	14
2. Resultate	16
a) Antikörper im Blutserum	16
b) Antikörper im Milchserum	19
II. Lebendvakzine mit Adjuvans	22
1. Material und Methodik	22
2. Resultate	23
a) Antikörper im Blutserum	23
b) Antikörper im Milchserum	27
III. Vergleich von Totvakzine und Lebendvakzine	30
1. Vergleich der Titerwerte im Blut	30
2. Vergleich der Titerwerte in der Milch	31

D. DISKUSSION	32
1. Wahl des Impfkeimes	32
2. Bedeutung der Antikörper in der Milch	32
3. Vakzinationserfolg	33
4. Vergleich beider Vakzinationsversuche	34
5. Praktische Verwendbarkeit der Vakzine	35
6. Testmethode	35
E. ZUSAMMENFASSUNG	36
F. LITERATURVERZEICHNIS	37

A. EINLEITUNG

Die Mastitis stellt heute die häufigste Infektionskrankheit der Milchkühe dar. In der Bundesrepublik Deutschland weisen etwa 20 bis 25 % aller Kühe erhöhte Zellzahlen in der Milch auf (23). In der Schweiz dürften die Verhältnisse ähnlich liegen, wobei hier mindestens 60 % der Störungen infektiös bedingt sind. Die systematische Bekämpfung dieser Krankheit liegt im Interesse aller an Milchproduktion und -verarbeitung beteiligten Wirtschaftskreise, da sie ökonomische, technologische und hygienische Probleme verursacht.

Nach Tilgung der klassischen durch die Milch übertragbaren Seuchen wie Brucellose und Tuberkulose steht die Mastitisbekämpfung im Mittelpunkt des milchhygienischen Interesses. Zurzeit stehen dabei folgende Massnahmen im Vordergrund:

1. Chemotherapie während Laktation und Trockenperiode
2. Zitzendesinfektion
3. Technische Optimierung der Melkanlagen
4. Verbesserungen im Management des Milchentzugs

Dank diesen Massnahmen können die Mastitiden zwar auf ein ökonomisch und hygienisch vertretbares Mass reduziert werden, die Ausmerzung der Krankheit gelingt jedoch nicht. Aus diesem Grunde wird wieder vermehrt versucht, das natürliche Abwehrsystem des Euters in die Mastitisbekämpfung einzubeziehen.

Bei der natürlichen Infektionsabwehr im Euter spielen neben unspezifischen Faktoren wie Phagozytose, Interferon, Properdin, Komplement, Lysozym, Laktoferrin etc. auch die spezifischen Abwehrmechanismen des Immunsystems eine wichtige Rolle. Es handelt sich dabei um die zellulären und humoralen Antikörper.

Durch künstliche Stimulation des Immunsystems mittels Vakzination wird versucht, die Antikörperproduktion anzuregen, um so die Widerstandskraft der Kühe gegen Mastitiden zu erhöhen. Versuche dieser Art wurden schon um die Jahrhundertwende aufgenommen, dann aber während langer Zeit zugunsten der vielversprechenden Antibiotikaforschung in den Hintergrund gestellt. Bis heute hat die Mastitisforschung auf dem Gebiet der Immunprophylaxe trotz Teilerfolgen nicht zur Entwicklung von praxisreifen Methoden geführt.

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen bezüglich Möglichkeiten der Immunisierung untersucht werden:

- a) Führt die Vakzination mit *Streptococcus agalactiae*, einem der häufigsten Mastitiserreger, beim Rind zu einem Antikörperanstieg in Blut- und Milchserum?
- b) Bestehen Unterschiede des Titeranstieges zwischen verschiedenen Vakzinationsmethoden?

B. LITERATURBESPRECHUNG

1. Das Immunsystem des Rindes

Das Immunsystem des Rindes stimmt im wesentlichen mit dem anderer Tierarten überein. Eine Ausnahme von dieser Regel bilden die Verhältnisse in der Milchdrüse, da hier grosse tierartliche Unterschiede auftreten.

Antigene Reize, z.B. bakterielle Infektionen, werden vom Körper mit unspezifischen Abwehrmechanismen und mit der Bildung von spezifischen zellulären und humoralen Antikörpern (Immunglobulinen) beantwortet.

Ueber die Bedeutung der zellulären Antikörper ist beim Rind noch wenig bekannt. Im folgenden soll nur von den humoralen Antikörpern, den Immunglobulinen, die Rede sein.

Immunglobuline (Ig) sind Proteine, die fähig sind, mit dem Antigen, das ihre Bildung induziert hat, spezifisch zu reagieren und es im günstigen Fall für den Körper unschädlich zu machen. Unter Umständen reagiert ein Immunglobulin mit verschiedenen Molekülen, die aber eine starke chemische Aehnlichkeit aufweisen müssen. Dieses Phänomen wird als Kreuzimmunität bezeichnet.

Man unterscheidet bis jetzt beim Rind drei Immunglobulinklassen, welche für die Infektionsabwehr wichtig sind: IgG, IgA und IgM. Die Klasse der IgG wird aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität und anderer Kriterien in die zwei Subklassen IgG₁ und IgG₂ unterteilt (11).

Ueber die Verteilung der verschiedenen Immunglobuline in Blut, Milch und Kolostrum gibt Tab. 1 Auskunft. Daraus ist ersichtlich,

dass mengenmässig IgG₁ sowohl im Blutserum als auch im Kolostrum mit Abstand das wichtigste Immunglobulin darstellt, eine Tatsache, die von verschiedenen Autoren bestätigt wird (6, 20, 22).

Das Verhältnis IgG₁ zu IgG₂ ist im Kolostrum höher als in der Milch und in der Milch höher als im Blut. Im mastitiskranken Euter gleicht sich der Antikörpergehalt der Milch dem des Blutes an.

Antikörperklasse	IgA	IgG ₁	IgG ₂	IgM
Blutserum	30	1050	790	250
Milch	5	35	6	4
Kolostrum	440	7500	190	490

Tab. 1: Mittlere Immunglobulinkonzentration in Blut, Milch und Kolostrum. Mengenangaben in mg/100 ml.

Adaptiert nach MACH und PAHUD (16).

2. Die Immunantwort in der Milchdrüse

Da die Mastitiserreger fast ausschliesslich durch den Strichkanal und nicht systemisch auf dem Blutweg ins Euter gelangen, dürfte für die Elimination dieser Keime der Antikörpergehalt der Milchdrüsensekrete wichtiger sein als der Antikörpertiter im Blut.

Die Frage, wo die in der Milch auftretenden Antikörper gebildet werden (systemische oder lokale Antikörpersynthese) und wie sie in die Milch gelangen, ist heute teilweise geklärt.

Grundsätzlich stehen drei Möglichkeiten offen:

a) Systemische Bildung und passive Filtration der Antikörper vom Blut in die Milch

Da das Drüsenepithel ausser zur Zeit des Trockenstellens und der Geburt eine fast absolute Impermeabilität für Antikörper aufweist,

spielt diese Möglichkeit in der gesunden Milchdrüse eine unbedeutende Rolle (8). Es wird angenommen, dass vor allem IgG₂ passiv filtriert wird, was seine niedrige Konzentration in Kolostrum und Milch erklären würde (20).

In der entzündeten Milchdrüse nimmt die Permeabilität stark zu, das Milchserum wird deshalb in seiner Zusammensetzung dem Blutserum sehr ähnlich.

b) Systemische Synthese und aktiver Transport der Antikörper vom Blut in die Milch

Für IgG₁ existiert beim Rind ein aktiver selektiver Transportmechanismus, der die Antikörper auch gegen ein Konzentrationsgefälle vom Blut ins Kolostrum befördert (3, 5, 13, 20, 21). Wenn präpartal der IgG₁-Spiegel im Milchdrüsensekret ansteigt, fällt der IgG₁-Spiegel im Blut (4); die Immunglobuline, die aus dem Blut verschwinden, erscheinen im Kolostrum (22). Die Intensität des Transportes ist abhängig vom Oestrogen- und Progesterongehalt des Blutes (25).

In den ersten Tagen post partum nimmt die Transportrate rasch ab, bleibt aber während der ganzen Laktation zu einem geringen Teil bestehen (17).

Für IgG₂ ist kein solcher Transportmechanismus vorhanden; dies erklärt, wieso das Verhältnis von IgG₁ zu IgG₂ im Kolostrum höher ist als in der Milch und im Blut.

Bei einer akuten Mastitis wird der aktive Transport blockiert (17) und gleichzeitig die Permeabilität des Epithels erhöht; das Verhältnis von IgG₁ zu IgG₂ ist dann in der Milch ähnlich wie im Blut.

Der Mensch sowie Tiere, bei welchen Antikörper vorwiegend via Placenta auf den Fötus übertragen werden, besitzen im Gegensatz zum Rind die Fähigkeit zur Anreicherung von IgG₁ im Kolostrum nicht (26). Dort ist lokal gebildetes IgA der hauptsächliche Kolostralantikörper.

c) Lokale Antikörpersynthese im Euter

Sowohl In-vitro-Studien mit Gewebekulturen (7, 29) als auch In-vivo-Beobachtungen (12, 14, 16, 20) lassen annehmen, dass die Milchdrüse des Rindes zur lokalen Synthese von IgG, IgA und IgM befähigt ist.

Die Syntheserate scheint peripartal, zur Zeit der stärksten Plasmazellbesiedelung des Euters, am höchsten zu sein (15, 27). Im Kolostrum können über 50 % der IgM von der Drüse selbst gebildet werden (20). Für IgA werden noch höhere prozentuale Werte angegeben (20). Während der Laktation kommt die lokale Antikörpersynthese fast zum Stillstand, sie kann aber durch Antigenstimulation wieder erhöht werden (20).

Die Fähigkeit zur mammären IgA-Synthese ist beim Rind viel geringer als beim Menschen oder bei Tieren, die nicht über einen selektiven Transportmechanismus für IgG₁ verfügen (5, 16).

3. Möglichkeiten der Steigerung des Antikörpergehaltes von Blut und Milch

Durch Vakzinationsexperimente wurde wiederholt versucht, den Gehalt an spezifischen Antikörpern gegen Mastitiserreger im Blut und in der Milch der Versuchstiere zu erhöhen. Zusammensetzung der Vakzine, Applikationsort und -zeitpunkt waren dabei unterschiedlich.

Applikationsort und -zeitpunkt

Die möglichen Applikationsarten einer Vakzine und die daraus resultierende Antikörperbildung sind in einem Schema von HUEBNER et al. dargestellt (Abb. 1).

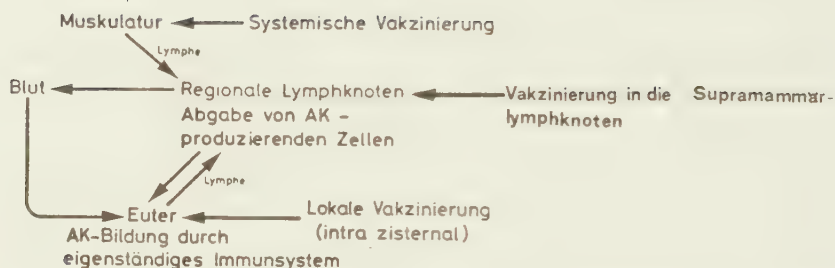


Abb. 1: Wege der Antikörperbildung nach Vakzination (9, modifiziert)

Systemische Vakzination: Bei der systemischen Vakzination wird das gesamte Lymphsystem des Körpers aktiviert, was zu einem hohen Antikörpertiter im Blut führt. Sind die Antikörper vom IgG₁-Typ, können sie präpartal in grossen Mengen ins Kolostrum transportiert werden. Zu Beginn der Involutionsphase der Milchdrüse soll eine Einwanderung von Plasmazellen, Lymphozyten oder lymphoiden Zellen aus dem systemischen Pool ins Bindegewebe des Euters stattfinden (15). Erfolgt die systemische Vakzination kurz vor dieser Zellbesiedelung, kann es zu einer Anreicherung von spezifisch stimulierten Lymphozyten im Milchdrüsengewebe kommen, was zusätzlich zur systemischen eine lokale Antikörpersynthese bewirken kann.

Lokale Vakzination: Nach lokaler Vakzination, d.h. Infusion von Antigen durch den Strichkanal in die Zitzenzisterne, werden lokal im Milchdrüsengewebe Antikörper gebildet. Die stärkste Antikörperproduktion erfolgt, wenn präpartal zur Zeit der vermehrten Plasmazellbesiedelung des Euters geimpft wird. Zusätzlich ergibt sich auch bei lokaler Immunisierung eine systemische Antwort, d.h. ein Antikörperanstieg im Blut (15, 27). Dies dürfte auf die Abwanderung von Antikörper produzierenden Zellen aus dem Euter zurückzuführen sein.

Vakzination in die regionalen Lymphknoten: NORCROSS (22) konnte durch die Applikation einer Vakzine in die supramammären Lymphknoten hohe Antikörpertiter im Blut und in der Milch induzieren. Diese Methode scheint der lokalen Immunisierung aller Euterviertel überlegen, da sie einfacher in der Durchführung ist und nicht die Gefahr einer iatrogen induzierten Mastitis in sich birgt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl lokale als auch systemische Vakzinierung zu einem Antikörperanstieg in Blut und Milch führen können, mit besten Erfolgen bei der Kombination beider Methoden (27). Für eine systemische Immunisierung empfiehlt sich der Zeitpunkt des Trockenstellens, für eine lokale Immunisierung die frühe Trockenperiode (27). Eine gleichwertige, wenn nicht bessere Alternativmethode ist nach NORCROSS die Impfung in die regionalen Lymphknoten.

Zusammensetzung der Vakzine

Da eine Mastitis durch eine Vielzahl von Keimen verursacht werden kann, müsste eine wirksame Vakzine alle Mastitiserreger beinhalten, die keine Kreuzimmunität bewirken, oder zumindest Antigenkomponenten aller Mastitiserreger. Die in der Literatur beschriebenen Vakzinen enthielten meist abgetötete ganze Bakterien, bei Staphylokokkenvakzinen oft in Kombination mit Toxinen. Bei systemischer Immunisierung wurden durch den Zusatz eines öligen Adjuvans durchwegs bessere Resultate erzielt.

4. Immunität gegen Streptococcus agalactiae (22)

Alle Streptokokken, die in ihrer Zellwand ein bestimmtes Polysaccharidantigen, die sogenannte "C-Substanz", aufweisen, werden der Gruppe B (= Streptococcus agalactiae = Gelbgaltstreptokokken) zugeteilt.

Zusätzlich zu dieser C-Substanz besitzen alle Gelbgaltstreptokokken mindestens ein weiteres Antigen. Aufgrund dieser zusätzlichen Antigene unterteilt man die Gruppe B in Typen. Bis heute sind sieben verschiedene Typen bekannt; fünf davon tragen Polysaccharidantigene (Typ Ia, Ib, Ic, II und III), zwei weitere tragen Proteinantigene (Typ R und X).

Nach NORCROSS (22) induzieren die typenspezifischen Polysaccharidantigene die Bildung von protektiven Antikörpern, d.h. von Antikörpern, die Schutz vor einer Infektion bieten. Die Polysaccharide führen nicht zur Bildung von Kreuzimmunitäten. Die gruppenspezifische C-Substanz, die bei allen Typen vorkommt, bewirkt zwar beim Rind eine Antikörperproduktion; diese Antikörper haben aber keine Schutzfunktion.

Das gleiche gilt auch für die beiden typenspezifischen Proteinantigene. Zwischen diesen beiden Antigenen treten Kreuzreaktionen auf.

5. Vakzinationsversuche mit *Streptococcus agalactiae*

In der Literatur nach 1958 waren nur vier grossangelegte Vakzinationsversuche mit *Sc. agalactiae* zu finden. Der Erfolg dieser Versuche wurde gemessen an der Reduktion der Zahl und der Ausprägung der auftretenden Gelbgaltmastitiden. Titerbestimmungen waren nur in einem Fall durchgeführt worden. Die Resultate sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Von allen Autoren wurden inaktivierte Bakterien als Antigen verwendet. Drei der vier Vakzinationsversuche wurden an Problemherden mit gehäuftem Auftreten von Gelbgaltmastitiden durchgeführt (10, 18, 19). Alle Arbeiten erbrachten den Nachweis, dass bei geimpften Tieren weniger Neuinfektionen auftreten. In zwei Herden konnte durch den Einsatz einer Vakzine in Kombination mit antibiotischer Therapie die vollständige Tilgung der Gelbgaltmastitiden erreicht werden (10, 19).

Autoren	Applikationsort	Art der Vakzine	Versuchstiere	Erfolg
BRACEWELL PATTISON 1958 (2)	subkutan	formalininaktivierte Bakt.	19 Impfkühe 15 Kontrollkühe	Agglutininantiteranstieg im Blut (Titer von 4 bis 128). Weniger Infektionen bei künstl. Exposition.
MURA PISANU 1960 (18)	subkutan	penicillininaktivierte, stall-spez. Bakt. Typen R, II, III	Problemherde Feldversuch 107 Impfkühe 19 Kontrollkühe	Bei Impftieren 50 % bestehender Infektionen eliminiert, bei Kontrolltieren 0 %. Weniger Neuinfektionen bei geimpften Tieren.
MURA PISANU 1962 (19)	subkutan	penicillininaktivierte, stall-spez. Bakt. Typen R, II, III	Problemherde Feldversuch 106 Impfkühe 36 Kontrollkühe	Tilgung nach Vakzination und antibiotischer Therapie.
JOHNSON NORCROSS 1970 (10)	Euterlymphknoten	formalininaktivierte, stall-spezifische Bakt. Typ II	Problemherde Feldversuch ca. 60 Kühe	Tilgung nach Vakzination und antibiotischer Therapie.

Tab. 2: Vakzinationsversuche mit *Sc. agalactiae*

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Totvakzine ohne Adjuvans

1. Material und Methodik

Versuchstiere

Für Versuch 1 stand eine Gruppe von fünf laktierenden Kühen zur Verfügung. Da als Impfkkeim *Sc. agalactiae* verwendet und der Impferfolg mit einer Agglutinationsmethode ermittelt wurde, mussten die Tiere zusätzlich gelbgaltfrei sein und durften im Blut keine agglutinierenden Antikörper gegen den Impfkkeim aufweisen.

Impfstamm

Als Impfkkeim wurde *Streptococcus agalactiae* Typ II ("18 RS 21", Streptokokkenzentrale Kiel) verwendet. Die Wahl fiel auf diesen Stamm, weil er mit relativ geringem Aufwand genau identifiziert werden kann und weil er in der Region Zürich mehrfach als Mastitiserreger nachgewiesen werden konnte.

Vakzineherstellung: Totvakzine ohne Adjuvans

1. Ueberimpfen einer Kolonie des Impfkkeimes in 500 ml Trypticase-Bouillon.
2. Bebrütung während 48 Stunden bei 37° C.
3. Sedimentieren der Keime durch Zentrifugieren (10 Min./1500 g).
4. Zweimaliges Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung und anschliessendes Zentrifugieren.
5. Aufschwemmen des Sedimentes mit 40 ml physiologischer NaCl-Lösung.
6. Inaktivieren während einer Stunde bei 60° C.
7. Sterilitätskontrolle.

Applikationsort, Dosis und Anzahl der Immunisierungen

Den Versuchskühen wurde dreimal im Abstand von einer Woche eine Dosis von 2 ml in die supramammären Lymphknoten appliziert.

Probeentnahme zur Prüfung des Impferfolges

Während des Versuches wurde anfangs wöchentlich der Antikörpertiter in Blut- und Viertelgemelksproben ermittelt; später wurde nur noch der Bluttitert bestimmt. Den genauen zeitlichen Ablauf von Versuch 1 zeigt Abb. 2.

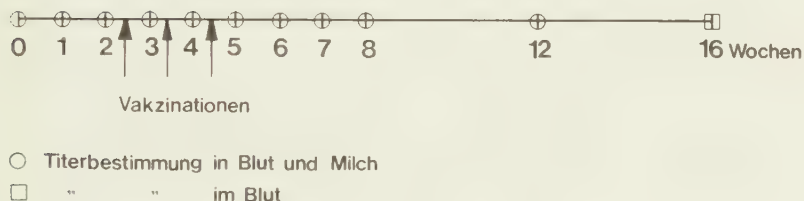


Abb. 2: Zeitlicher Ablauf von Versuch 1 (Totvakzine)

Prüfung des Impferfolgs

Die Objektivierung der Impfreaktion erfolgte durch den Nachweis von agglutinierenden Antikörpern in Blut- und Milchserum mittels einer Langsamagglutination, wie sie im einzelnen von SCHEUER-MEIER (24) beschrieben wurde.

2. Resultate

a) Antikörper im Blutserum

Eine Uebersicht über den Verlauf der Antikörpertiter im Blutserum vermittelt Abb. 3.

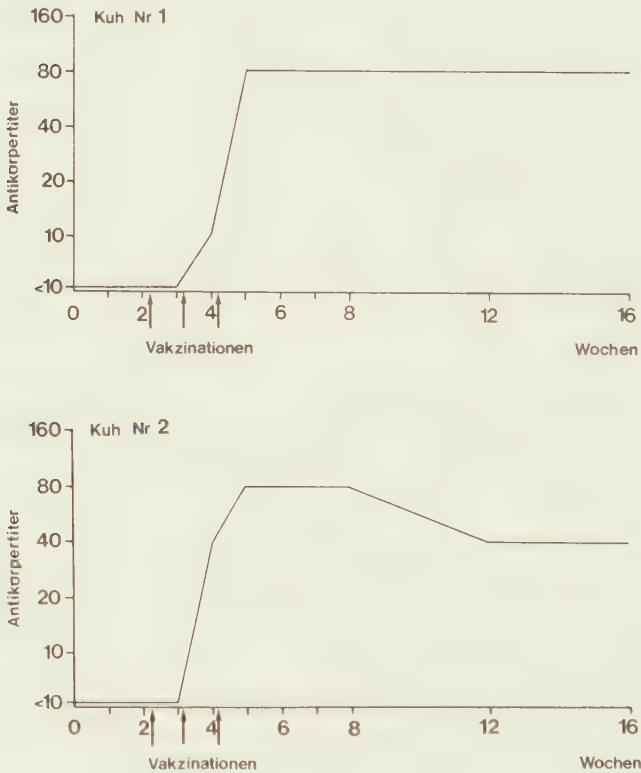


Abb. 3/1: Antikörper im Blutserum der fünf Versuchstiere

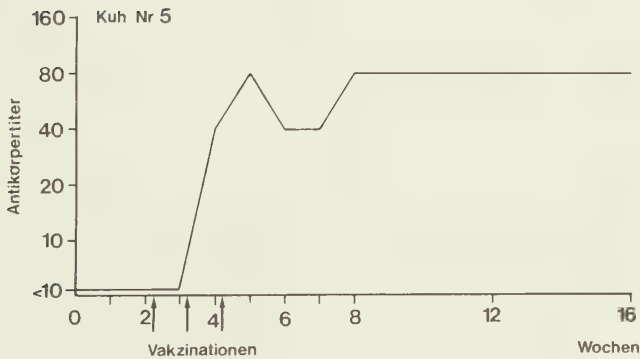
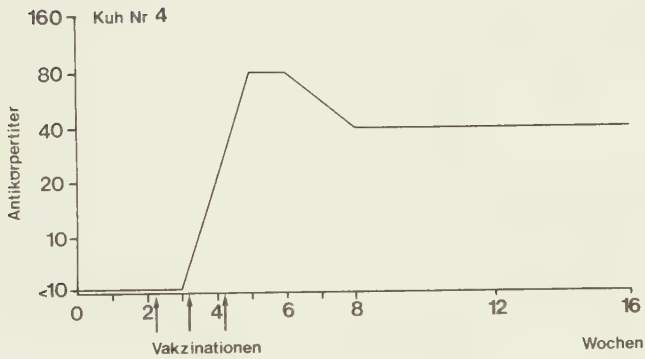
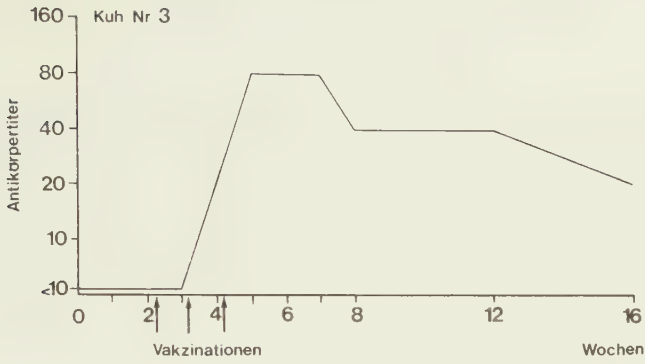


Abb. 3/2: Antikörper im Blutserum der fünf Versuchstiere

Wie bereits in den Versuchsbedingungen erwähnt, wies vor der Impfung keines der Tiere Antikörper gegen den Impfkern auf. Auch eine Woche nach der ersten Impfung traten noch keine Antikörper auf. Eine Woche nach der zweiten Impfung wurden jedoch schon Titer von 10 bis 40 gemessen, und eine Woche nach der dritten und letzten Impfung wiesen die Blutproben aller Kühe einen Titer von 80 auf, der in den folgenden drei Wochen bei einigen Tieren auf 40 absank.

In den nächsten zwei Monaten machte sich eine weitere leichte Abnahme bemerkbar. Drei Monate nach der letzten Vakzination betrug der Antikörpertiter bei einer Kuh 20, bei zwei weiteren 40, und bei den übrigen zwei Kühen war noch der Höchstwert von 80 feststellbar.

Aus Abb. 4 sind die Durchschnittstiter im Blut aller fünf Versuchskühe ersichtlich. Nach der zweiten Antigeninjektion erfolgte ein erster Titeranstieg auf 26, und eine Woche nach der letzten Impfung war bereits das Maximum von 80 erreicht. Danach zeigte sich ein langsames Absinken auf 52.

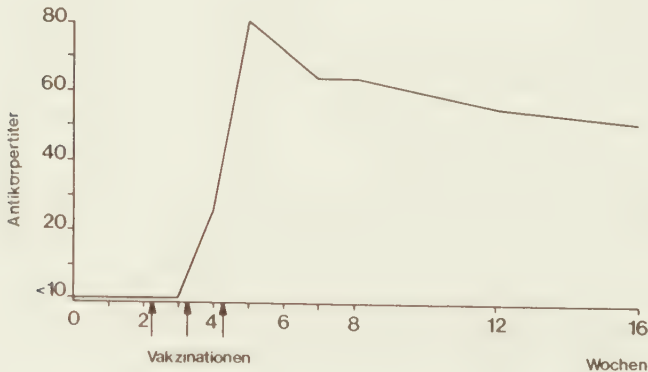


Abb. 4: Arithmetisches Mittel der Titerwerte im Blut

b) Antikörper im Milchserum

Eine Uebersicht über den Antikörpergehalt des Milchserums vermittelt Abb. 5.

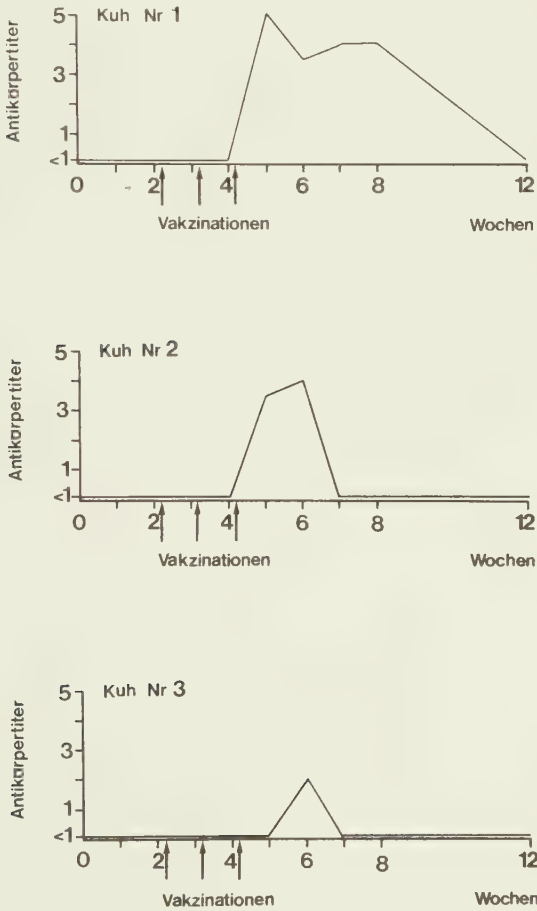


Abb. 5/1: Antikörpertiter im Milchserum der fünf Versuchskühe

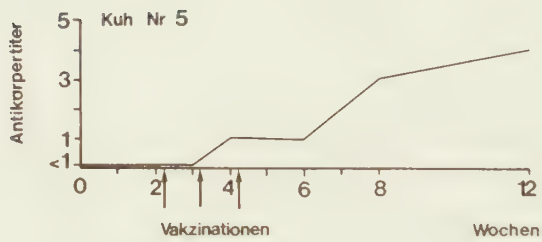
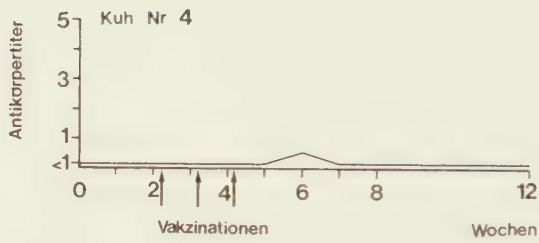


Abb. 5/2: Antikörpertiter im Milchserum der fünf Versuchskühe

Zur Titerbestimmung in der Milch wurden zwar Viertelgemelksproben entnommen, da jedoch nur sehr geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Vierteln festgestellt wurden, ist hier das arithmetische Mittel der vier Viertel jeder Kuh aufgezeichnet.

Aufgrund der Auslesekriterien wies vor der Impfung keines der Tiere Antikörper gegen den Impfkeim auf. Die erste Vakzination bewirkte keinen Titeranstieg, und auch nach der zweiten Impfung wurde nur bei einer Kuh ein leichter Anstieg beobachtet. Im ersten Monat nach der letzten Impfung liess sich bei allen Kühen ein Titeranstieg feststellen, der aber bei drei Tieren nur sehr gering und von kurzer Dauer war. Zwei Monate nach Abschluss der Impfung wies nur noch eine Kuh im Milchserum Antikörper auf.

Aus Abb. 6 sind die Durchschnittstiter aller Euterviertel im Verlauf der Versuchsdauer ersichtlich. Nach der dritten Vakzination stiegen die Titerwerte von Null auf ca. 2, waren jedoch schon zwei Wochen später auf ca. 1 abgesunken.



Abb. 6: Arithmetisches Mittel der Titerwerte in der Milch aller Kühe

II. Lebendvakzine mit Adjuvans

1. Material und Methodik

Versuchstiere

Wie in Versuch 1 stand eine Gruppe von fünf Kühen zur Verfügung. Die Auslesekriterien waren dieselben wie in Versuch 1.

Impfstamm

Es wurde derselbe Impfstamm verwendet wie für die Totvakzine.

Vakzineherstellung

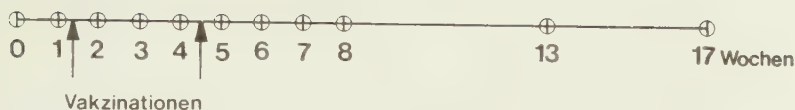
1. Ueberimpfen einer Kolonie des Impfkeimes in 500 ml Trypticase-Bouillon.
2. Bebrütung während 48 Stunden bei 37° C.
3. Sedimentieren der Keime durch Zentrifugieren (10 Min./1500 g).
4. Zweimaliges Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung und anschliessendes Zentrifugieren.
5. Aufschwemmen des Sedimentes mit 3 ml physiologischer NaCl-Lösung.
6. Nach Zugabe von 10 ml komplettem Freundschem Adjuvans mittels Ultraschallgerät durchmischen.

Applikationsort, Dosis und Anzahl der Immunisierungen

Den Versuchskühen des zweiten Versuchs wurde zweimal im Abstand von 3 1/2 Wochen eine Dosis von 1 ml appliziert. Die Dosis wurde auf fünf bis sechs Stellen verteilt intrakutan in der Gegend des Milchspiegels injiziert.

Probenentnahme zur Prüfung des Impferfolges

Wie in Versuch 1 wurden anfangs wöchentlich Blut- und Milchproben zur Antikörperbestimmung entnommen. Später erfolgten die Probenentnahmen in grösseren Abständen. Den zeitlichen Ablauf von Versuch 2 zeigt Abb. 7.



○ Titerbestimmung in Blut und Milch

Abb. 7: Zeitlicher Ablauf von Versuch 2 (Lebendvakzine)

Prüfung des Impferfolges

S. Versuch 1.

2. Resultate

a) Antikörper im Blutserum

Eine Uebersicht über den Verlauf der Antikörpertiter im Blutserum vermittelt Abb. 8.

Aufgrund der Auslesekriterien für die Versuchskühe wies auch bei diesem Versuch vor der Impfung keine Kuh Antikörper gegen den Impfkeim auf. Schon eine Woche nach der ersten Impfung wurden bei vier der fünf Kühe Titer von 1 : 10 bis 1 : 20 gemessen. In den folgenden zwei Wochen erfolgte bei allen Kühen ein weiterer leichter Anstieg. Die zweite Impfung führte bei allen Versuchstieren zu einer zusätzlichen Erhöhung. Zwei Wochen nach Abschluss der Vakzination wiesen die Blutproben aller Kühe Titer von 1 : 80 bis 1 : 160 auf. In den folgenden drei Monaten nahmen die Titer bei vier der fünf Kühe wieder leicht ab.

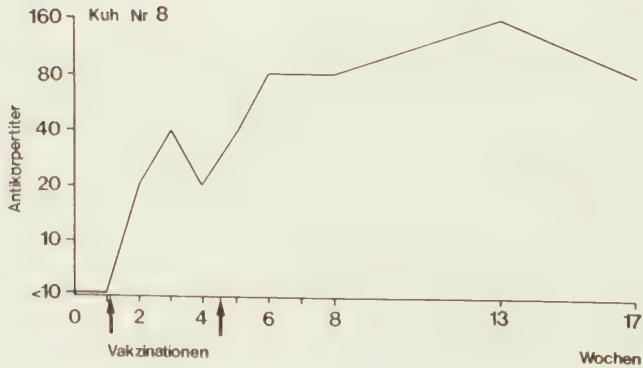
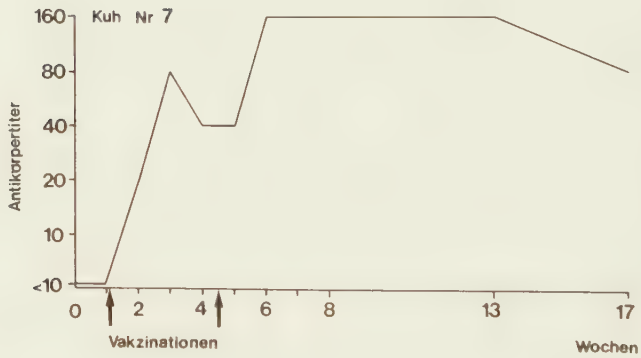
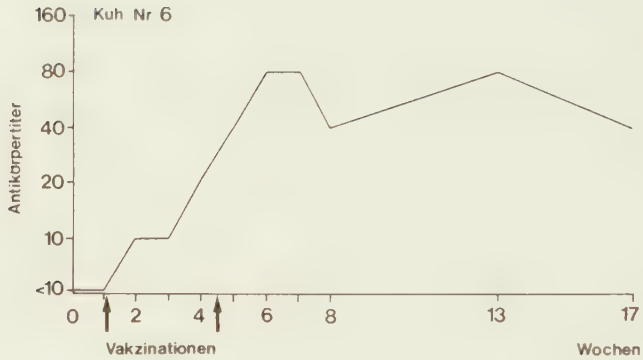


Abb. 8/1: Antikörpertiter im Blutserum der fünf Versuchskühe

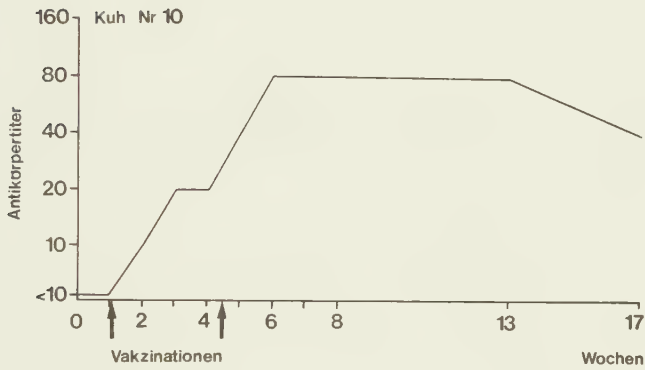


Abb. 8/2: Antikörpertiter im Blutserum der fünf Versuchskühe

Aus Abb. 9 sind die Durchschnittswerte der Bluttitler ersichtlich. Nach der ersten Impfung erfolgte ein geringer Titeranstieg auf 32, nach der zweiten Vakzination ein deutlicher auf 96. Die Werte blieben in ähnlicher Höhe während weiterer zwei Monate erhalten. Drei Monate nach Abschluss der Vakzination betrug der Mittelwert noch 56.

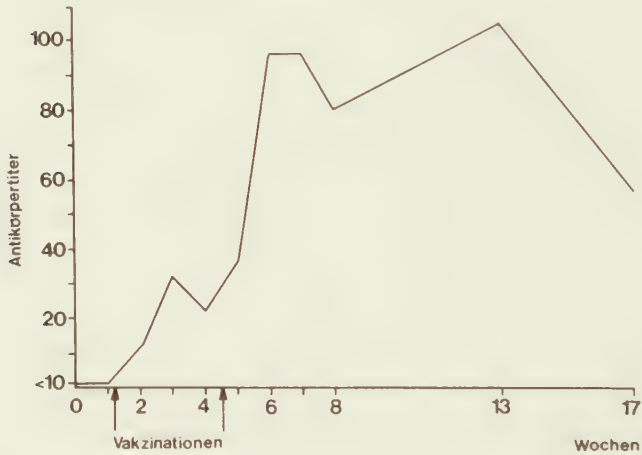


Abb. 9: Arithmetisches Mittel der Titerwerte im Blut aller Kühe

b) Antikörper im Milchserum

Eine Uebersicht über den Antikörpergehalt des Milchserums gibt Abb. 10.

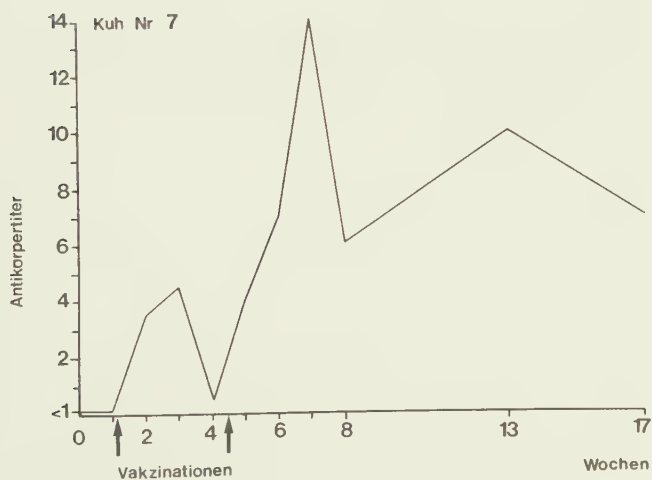
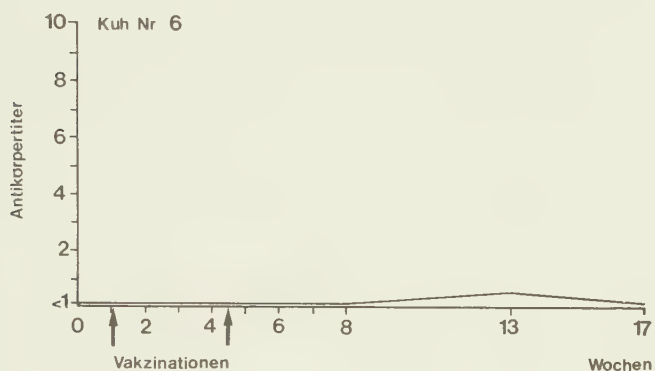


Abb. 10/1: Antikörper im Milchserum der fünf Versuchskühe

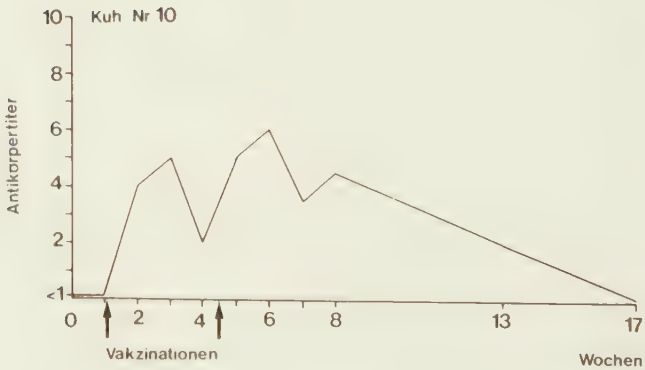
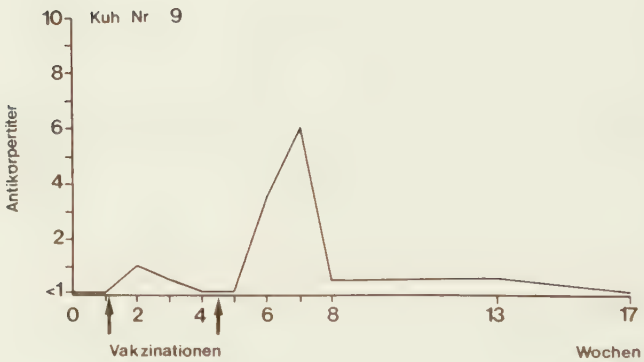
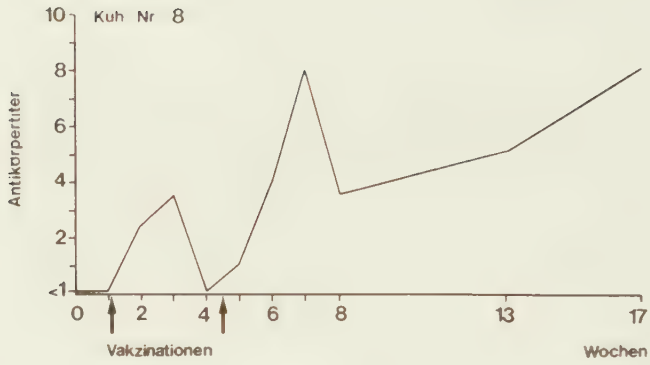


Abb. 10/2: Antikörper im Milchserum der fünf Versuchskühe

Vor der Impfung wurden in der Milch keine Antikörper festgestellt. Eine Woche nach der ersten Impfung trat bei vier der fünf Kühe ein leichter Anstieg auf, zwei Wochen später waren jedoch praktisch keine Antikörper mehr nachweisbar. Eine Woche nach der zweiten Impfung stiegen die Titer wieder auf 1 bis 5 an, in den folgenden zwei Wochen erfolgte bei allen Tieren ein weiterer Anstieg: es wurden Werte bis zu 14 gemessen. Bei drei Kühen hielt der Antikörpertiter nur bis zwei Monate nach der Impfung an, bei zwei Kühen waren auch nach drei Monaten noch Antikörper feststellbar.

Abb. 10 gibt Auskunft über die Durchschnittswerte der Viertels-gemelke aller Versuchskühe. Nach der ersten Antigeninjektion stieg das Titermittel von Null auf 2,2, dann auf 2,7 und sank darauf wieder auf 0,5. Nach der zweiten Vakzination nahmen die Werte wieder zu und erreichten mit 6,3 das Titermaximum. Einen Monat nach Abschluss der Impfung betrug das Titermittel aller Kühe noch ca. 3 und blieb in dieser Höhe noch einen weiteren Monat bestehen. Drei Monate nach Abschluss der Impfung wiesen die Milchseren dreier Kühe keine Antikörper mehr auf; bei den restlichen zwei Kühen wurden noch Werte von 7 bis 8 gemessen.



Abb. 11: Arithmetisches Mittel der Titerwerte in der Milch aller Kühe

III. Vergleich von Lebend- und Totvakzine

1. Vergleich der Titerwerte im Blut

In Abb. 12 sind die Mittelwerte der Bluttitert aus Versuch 1 und 2 dargestellt. Ein direkter Vergleich der beiden Versuche ist nur bedingt möglich, da der Zeitplan der Vakzination unterschiedlich war. Die Darstellung in Abb. 11 deutet aber doch darauf hin, dass beim zweiten Impfmodus (Lebendvakzine mit Adjuvans) die Antikörperbildung etwas rascher eintritt und dass auch etwas höhere Titer erreicht werden.

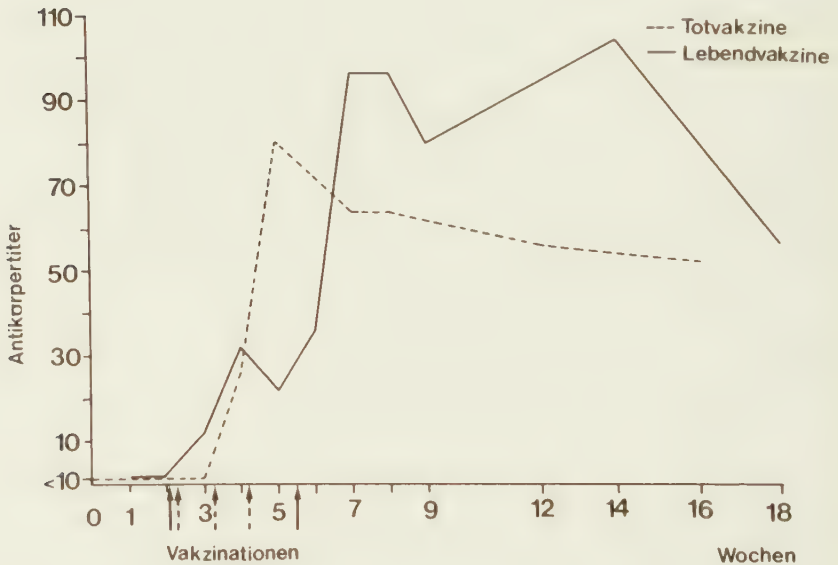


Abb. 12: Vergleich der Titerwerte im Blutserum

2. Vergleich der Titerwerte in der Milch

Aus Abb. 13 sind die Durchschnittstiter der Milch aus Versuch 1 und 2 ersichtlich. Auch hier ist ein Vergleich nur bedingt möglich. Der zweite Impfmodus scheint aber auch in der Milch rascher auftretende und höhere Antikörpertiter zu erzeugen.

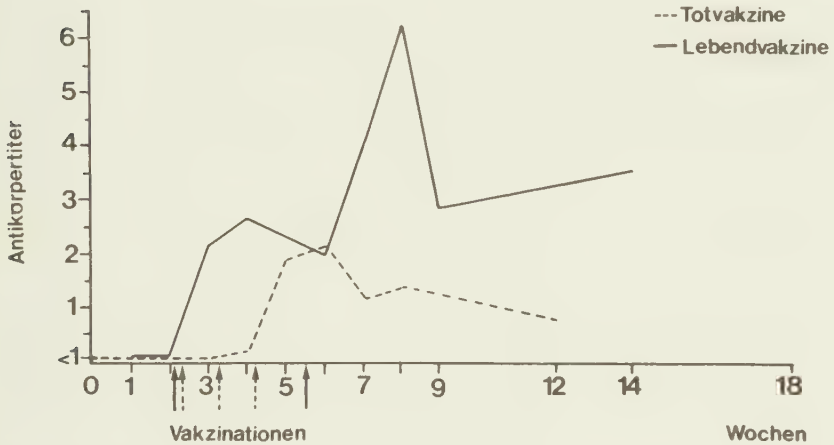


Abb. 13: Vergleich der Antikörpertiter in der Milch

D. DISKUSSION

1. Wahl des Impfkeimes

Gelbgaltstreptokokken verursachen in der Nordostschweiz ca. 15 - 20 % aller infektiösen Mastitiden und sind nach den Staphylokokken und "anderen" Streptokokken die dritthäufigsten Mastitiserreger. Sie sind bezüglich ihrer antigenen Eigenschaften besser erforscht als die anderen Mastitiserreger und eignen sich dementsprechend besser für Vakzinationsversuche. In unserem Fall wurde nur mit einem der sieben bis heute bekannten Gelbgalttypen geimpft. Welchen Prozentsatz der Gelbgaltmastitiden dieser Typ verursacht ist nicht bekannt. Falls, wie von verschiedenen Autoren angenommen wird, nie ein hundertprozentiger Impfschutz gegen Mastitiden erreicht werden kann, sondern nur eine erhöhte Widerstandskraft, dürfte der praktische Wert einer monovalenten Impfung gering sein. Den vorliegenden Untersuchungen kommt denn auch nur ein Modellcharakter zu. Es versteht sich von selbst, dass in einer praxistauglichen Vakzine alle häufigen Erreger, also Gelbgalt- und andere Streptokokken, Staphylokokken und wenn möglich auch koliforme Bakterien enthalten sein müssten. Dies setzt jedoch noch eine intensive Erforschung der Antigenität bzw. Immunogenität dieser letztgenannten Erreger voraus. Die "anderen" Streptokokken und Koliformen sind diesbezüglich teilweise untersucht, über antigene Wechselbeziehungen bei den Staphylokokken ist jedoch kaum etwas bekannt.

2. Bedeutung der Antikörper in der Milch

Zur Agglutination befähigte Antikörper gehören vor allem zur IgM-, in geringerem Masse zur IgA- und IgG-Klasse. Die Agglutination

erleichtert bei den Staphylokokken und vermutlich auch bei den Streptokokken die Phagozytose der Keime durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Agglutinine wirken also als Opsonine. Da grampositive Organismen nicht sehr empfindlich auf die komplementgebundene bakterizide Aktivität von Antikörpern sind, müssen durch eine Vakzine gegen diese Keime vermutlich immer opsonierende Antikörper induziert werden.

Da zur Phagozytose jedoch neutrophile Granulozyten nötig sind, wird in der Milch trotz Vakzination, zumindest vorübergehend, eine Neutrophilie auftreten. Eine Leukozytose ist aber gleichbedeutend mit Mastitis. Dies macht deutlich, mit welchen grundsätzlichen Problemen eine Impfung gegen Mastitiserreger verbunden ist.

3. Vakzinationserfolg

Beide in unseren Versuchen verwendeten Vakzinen vermochten den Antikörpergehalt im Blut und in der Milch der Versuchstiere zu erhöhen.

Die in den vorliegenden Versuchen erreichten Titerwerte im Blutserum sind mehrheitlich höher als die von BRACEWELL und PATTISON (2) beschriebenen. Dort wurden fünf Tage nach Abschluss der Vakzination Titer von 4 bis 128 (Mittelwert 27,6) gemessen. Bei den eigenen Untersuchungen wiesen die Kühe eine Woche nach Abschluss der Impfung Titer von 20 bis 80 (Mittelwert 56) auf. Ein Vergleich der absoluten Zahlen ist jedoch unzulässig, da gewisse Unterschiede in der Methodik und im Zeitablauf der Titerbestimmung bestehen. Die beiden Mittelwerte dürften etwa der gleichen Grössenordnung zugeteilt werden müssen.

Der Titer im Blutserum stieg sowohl in Versuch 1 als auch in Versuch 2 deutlich höher an und war von längerer Dauer als der Titer

im Milchserum. Dies lässt die Vermutung zu, dass eher eine systemische und weniger eine lokale Antikörpersynthese stattfand. Da zur Abwehr von Mastitiserregern vor allem der Antikörpergehalt der Milch wichtig erscheint, dürften unsere Vakzinationsmethoden, die beide nur eine geringe Antikörperkonzentration in der Milch bewirkten, verbesserungsbedürftig sein. Hohe Antikörperkonzentrationen im Blutserum können erst von Nutzen sein, wenn das Drüsenepithel geschädigt ist, d.h. wenn eine Mastitis bereits besteht. Laut Literaturangaben können bedeutend höhere Titer in der Milch erreicht werden, wenn statt während der Laktation, wie in unserem Falle, in der Zeit der Trockenperiode geimpft wird. Die starke Besiedelung mit immunkompetenten Zellen soll dann eine erhöhte lokale Antikörperproduktion im Euter ermöglichen.

4. Vergleich beider Vakzinationsversuche

In Versuch 2 (Lebendvakzine mit Adjuvans, intrakutan) wurden durchwegs geringgradig höhere Titer gemessen als in Versuch 1 (Totvakzine ohne Adjuvans, intralymphonodulär). Etwas deutlicher als bei den Blutwerten ist der Unterschied bei den Werten in der Milch. Ob dieser Unterschied statistisch signifikant ist, kann zufolge der kleinen Versuchstierzahl nicht beurteilt werden. Es bleibt auch offen, auf welchen der folgenden Parameter der Unterschied zurückzuführen wäre, da sie alle von Versuch 1 zu Versuch 2 verändert wurde

- Totvakzine/Lebendvakzine
- mit/ohne Adjuvans
- Impfort
- Dosis
- Applikationsintervalle

5. Praktische Verwendbarkeit der Vakzine

Ueber die praktische Verwendbarkeit der Vakzine kann nur wenig ausgesagt werden, weil in unseren Versuchen nicht geprüft wurde, ob die durch die Impfung induzierten Antikörper protektiver Natur sind, d.h. ob sie Schutz gegen eine Gelbgaltmastitis bieten. Dies müsste mit Tierversuchen, z.B. mit dem von NORCROSS beschriebenen Mäuseschutztest abgeklärt werden. Letztlich entscheidend sind aber erst die Ergebnisse von Infektionsversuchen an den geimpften Kühen. Die Beurteilung einer Vakzine mittels künstlicher Infektion ist jedoch schwierig, wenn nicht eine vollständige Immunität zu prüfen ist, sondern lediglich ein partieller Schutz quantifiziert werden soll. NORCROSS und DERBYSHIRE erwarten denn auch von der Vakzination nur eine erhöhte Widerstandskraft gegen Mastitiden, nicht eine vollständige Immunität.

Mit einer zu hohen Testdosis kann ein Impfschutz, der unter natürlichen Infektionsbedingungen ausreichen würde, durchbrochen werden. Werden zur Objektivierung eines Teilschutzes Parameter wie Milch-ertrag, Mastitisgrad und Zellzahlen verwendet, tritt als Schwierigkeit die Tatsache hinzu, dass diese Grössen starken Schwankungen, bedingt durch andere Einflüsse, unterworfen sind.

6. Testmethode

Da mit der Agglutinationsmethode nur ein Teil der gegen Oberflächenantigene gerichteten Antikörper erfasst werden, wäre die Verwendung einer Methode, mit welcher alle Antikörper gegen Streptokokkenantigene nachgewiesen werden können, wünschenswert. Es wäre zu prüfen inwieweit ELISA und GEDELISA dafür geeignet sind.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Zwei Gruppen zu je fünf Kühen wurden mit einer Streptococcus-agalactiae-Totvakzine (hitzeinaktiviert) bzw. mit einer Lebendvakzine (mit Adjuvans) geimpft.

Bei beiden Gruppen wurde mittels Röhrchenlangsamagglutination während vier Monaten der Antikörpertiterverlauf in Blut- und Milchserum verfolgt.

Beide Vakzinationsarten führten zu einem relativ hohen und lang anhaltenden Titeranstieg im Blutserum (Titer bis zu 80 bzw. 160) und zu einer viel geringeren und kürzer dauernden Erhöhung im Milchserum.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. BOTES, J. (1970)
Local immunotherapy of mastitis
J.S. Afr. vet. med. Ass. 41, Supplement, 44 ff.
2. BRACEWELL, C.D. and PATTISON, I.H. (1958)
Experimental streptococcal mastitis
XII. Further immunological studies in the cow
J. Comp. Path. 68, 121-131
3. BRANDON, M.R., WATSON, D.L. and LASCELLES, A.K. (1971)
The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary
secretion of cows
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 49, 613-623
4. BROCK, J.H., STEEL, E.D. and REITER, B. (1975)
The effect of intramuscular and intramammary vaccination
of cows on antibody levels and resistance to intramammary
infection by *Staphylococcus aureus*
Res. vet. Sci. 19, 152-158
5. BUTLER, J.E., WINTER, A.J. and WAGNER, G.G. (1970)
Symposium: bovine immune system, introduction
J. Dairy Sci. 54, 1309-1314
6. BUTLER, J.E. (1971)
Review of the bovine immunoglobulins
J. Dairy Sci. 54, 1315-1316
7. BUTLER, J.E., KIDDY, C.A., MAXWELL, C., HYLTON, M.B. and
ASOFSKY, R. (1971)
Synthesis of immunoglobulins by various tissues of the cow
J. Dairy Sci. 54, 1323-1324

8. DERBYSHIRE, J.B. (1962)
Immunity in bovine mastitis
Vet. Bull. 32 (1), 1-10
9. HUEBLER, C., HEESCHEN, W., TOLLE, A. und HAMANN, J. (1978)
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Bedeutung des sekretorischen Immunglobulin A (SIgA) für die Infektionsabwehr der bovinen Milchdrüse
1. Isolierung und Identifizierung von Immunglobulinen
Milchwissensch. 33 (1), 1-6
10. JOHNSON, S.D. and NORCROSS, N.L. (1970)
An experimental method of vaccination for a Streptococcus agalactiae infected herd
Cornell Vet. 61, 258-264
11. KEHOE, J.M. (1971)
Subclasses of bovine IgG
J. Dairy Sci. 54, 1317
12. LASCELLES, A.K., OUTERIDGE, P.M. and MACKENZIE, D.D.S. (1966)
Local production of antibody by the lactating mammary gland following antigenic stimulation
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 44, 169-180
13. LASCELLES, A.K., MACKENZIE, D.D.S. and OUTERIDGE, P.M. (1971)
Immunity to mastitis
J. Dairy Sci. 54, 284-285
14. McDOWELL, G.H. and LASCELLES, A.K. (1971)
Local production of antibody by the lactating mammary gland of the ewe and the effect of systemic immunization
Res. vet. Sci. 12, 113-118

15. McDOWELL, G.H. and WATSON, D.L. (1974)
Immunity to experimental staphylococcal mastitis:
comparison of local and systemic immunisation
Aust. vet. J. 50, 533-536
16. MACH, J.-P. and PAHUD, J.-J. (1971)
Secretory IgA a major immunoglobulin in most bovine
external secretions
J. Immunol. 106, 552-563
17. MACKENZIE, D.D.S. and LASCELLES, A.K. (1968)
The transfer of 131 I-labelled immunoglobulins and
serum albumin from blood into milk of lactating ewes
Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 46, 285-294
18. MURA, D. and PISANU, S. (1960)
An experiment of vaccine-therapy against Streptococcus
agalactiae
Vet. ital. XI, 449-457
19. MURA, D. and PISANU, S. (1962)
Results obtained in bovine streptococcal mastitis with
an antibiotic-treated vaccine and topical penicillin
therapy
Vet. ital. XIII, 107-119
20. NEWBY, T.J. and BOURNE, J. (1977)
The nature of the local immune system of the bovine
mammary gland
J. Immunol. 118, 461-465
21. NORCROSS, N.L. (1971)
Immune response in the mammary gland
J. Dairy Sci. 54, 1880-1885

22. NORCROSS, N.L. (1971)
Acquired immunity to streptococcal mastitis
World Ass. for Buiatrics, 1971, 15-24
23. RUDOLPHI, K., MEYER, F. und SENFT, B. (1977)
Das natürliche Abwehrsystem des Euters
Prakt. Tierarzt 58, 489-490
24. SCHEUERMEIER, S.
Vet. Diss., Zürich; in Vorbereitung
25. SMITH, K.L. (1971)
The role of estrogen in the selective transport of
IgG₁ into the mammary gland
J. Dairy Sci. 54, 1322-1323
26. VAERMAN, J.-P. (1971)
Comparison between several mammalian IgAs,
including the bovine
J. Dairy Sci. 54, 1317-1318
27. WATSON, D.L. and LASCELLES, A.K. (1975)
The influence of systemic immunisation during
mammary involution on subsequent antibody
production in the mammary gland
Res. vet. Sci. 18, 182-185
28. YOKOMIZO, Y. and NORCROSS, N.L. (1978)
Bovine antibody against Streptococcus agalactiae
Type Ia, produced by preparturient intramammary
and systemic vaccination
Am. J. vet. Res. 39, 511-516

29. YURCHAK, A.M., BUTLER, J.E. and TOMASI, T.B. (1971)
Fluorescent localization of immunoglobulins in the
tissues of the cow
J. Dairy Sci. 54, 1324-1325

Herrn Prof. Dr. M. Berchtold danke ich für die Ueberlassung des Themas und Herrn Dr. R. Müller für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich Frau M. Thaller von der Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie für ihre tatkräftige Mithilfe und Beratung bei der Laborarbeit sowie meiner Schwester, Frau M. Lagerström, für die Reinschrift des Manuskripts.

LEBENS LAUF

Am 31. Oktober 1950 wurde ich als Tochter des Landwirts Fritz Mathys, wohnhaft in Ludetswil, und seiner Ehefrau, Clara Mathys-Meili, geboren.

Nach dem Besuch von Primar- und Sekundarschule in der Gemeinde Russikon trat ich 1966 in die Kantonsschule Zürcher Oberland in Wetzikon ein, wo ich 1970 die Maturitätsprüfung Typ C bestand.

Anschliessend an einen einjährigen Englandaufenthalt begann ich 1971 an der Universität Zürich das Studium der Veterinärmedizin, welches ich im Herbst 1976 mit dem Staatsexamen abschloss.

